

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-283283
 (43)Date of publication of application : 29.10.1996

(51)Int.CI. C07H 1/08
 A61K 35/78
 C07D311/36
 C07H 17/07
 C12P 17/06

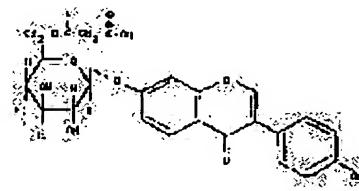
(21)Application number : 07-112705

(71)Applicant : KIKKOMAN CORP

(22)Date of filing : 14.04.1995

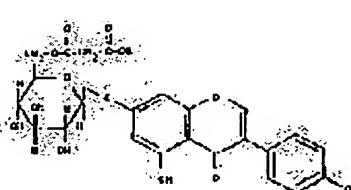
(72)Inventor : MATSUURA MASARU
 OBATA AKIO
 TOBE KOUICHIROU
 YAMATSUGU NOBUYUKI**(54) MALONYLISOFLAVONE GLUCOSIDE AND METHOD FOR OBTAINING ISOFLAVONE GLUCOSIDE OR ISOFLAVONE AGLYCON FROM THE SAME SUBSTANCE****(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain the subject compound as a raw material of compounds having pharmacological effects such as antimicrobial, antioxidanting and carcinostatic properties by passing an extraction solution obtained by extracting soybean with water through an absorbent, absorbing an extracted malonylisoflavone glycoside and eluting the absorbed material with an aqueous solution of an alcohol.



II

CONSTITUTION: Soybean is heated so that the temperature of soybean becomes about 80° C under atmosphere of ≥120° C and divided into half by a rubber roller, cooled and seed coat is separated and removed, and the periderm-removed soybean is immersed in a warm water heated to 50° C for 2hr while controlling pH to 8.0 to be extracted and pH of the extract solution is controlled to 4.0 and the extract solution is allowed to stand and subjected to decantation to afford the supernatant. Then, the supernatant is passed through a column in which a synthetic absorbent is packed to absorb a malonylisoflavone glycoside in the extraction solution and the absorbed material is eluted using an aqueous solution of alcohol and the eluate is concentrated and purified by a gel permeation to provide the objective malonylisoflavone glycoside expressed by formulas I and II, etc., capable of providing isoflavone glycoside or its aglycon having estrogen action, antimicrobial action, antioxidanting action, carcinostatic action, etc.



III

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 23.03.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 12.04.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-283283

(43)公開日 平成8年(1996)10月29日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 H 1/08			C 07 H 1/08	
A 61 K 35/78			A 61 K 35/78	J
C 07 D 311/36			C 07 D 311/36	
C 07 H 17/07			C 07 H 17/07	
C 12 P 17/06			C 12 P 17/06	

審査請求 未請求 請求項の数11 FD (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平7-112705

(22)出願日 平成7年(1995)4月14日

(71)出願人 000004477

キッコーマン株式会社

千葉県野田市野田339番地

(72)発明者 松浦 勝

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン

株式会社内

(72)発明者 小船 明雄

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン

株式会社内

(72)発明者 戸辺 光一朗

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン

株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マロニルイソフラボン配糖体及び該物質からイソフラボン配糖体又はイソフラボンアグリコンを取得する方法

(57)【要約】

【目的】 大豆中に含まれるマロニルイソフラボン配糖体を効率よく得る。また該物質からイソフラボン配糖体、そのアグリコンを得る。

【構成】 大豆の水抽出液を吸着剤に吸着させ、これをアルコール水溶液で溶出させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 大豆を水抽出し、この水抽出液を吸着剤に接触させて抽出液中のマロニルイソフラボン配糖体を吸着させ、次いでアルコール水溶液を用いて溶出させることを特徴とするマロニルイソフラボン配糖体の取得方法。

【請求項2】 大豆の水抽出液として、脱皮大豆の水抽出液を使用することを特徴とする請求項1記載のマロニルイソフラボン配糖体の取得方法。

【請求項3】 大豆の水抽出液として分離大豆蛋白質製造時に副生するホエーを使用することを特徴とする請求項1記載のマロニルイソフラボン配糖体の取得方法。

【請求項4】 マロニルイソフラボン配糖体がマロニルダイジン又はマロニルゲニスチンである請求項1～3のマロニルイソフラボン配糖体の取得方法

【請求項5】 大豆の水抽出液から取得したマロニルイソフラボン配糖体を加熱処理及び／又はアルカリ処理してイソフラボン配糖体とすることを特徴とするイソフラボン配糖体の取得方法。

【請求項6】 マロニルイソフラボン配糖体の溶液を70℃以上で加熱処理してイソフラボン配糖体とすることを特徴とする請求項5記載のイソフラボン配糖体の取得方法。

【請求項7】 マロニルイソフラボン配糖体の溶液をpH8以上でアルカリ処理し、イソフラボン配糖体とすることを特徴とする請求項5記載のイソフラボン配糖体の取得方法。

【請求項8】 大豆の水抽出液から取得したマロニルイソフラボン配糖体溶液を加熱処理及び／又はアルカリ処理してイソフラボン配糖体溶液とし、これを酸処理又は酵素処理してイソフラボンアグリコンとすることを特徴とするイソフラボンアグリコンの取得方法。

【請求項9】 イソフラボン配糖体溶液を希塩酸含有アルコール水溶液中で加熱処理してイソフラボンアグリコンとすることを特徴とする請求項8記載のイソフラボンアグリコンの取得方法。

【請求項10】 イソフラボン配糖体溶液をβ-グルコシダーゼにより加水分解してイソフラボンアグリコンとすることを特徴とする請求項8記載のイソフラボンアグリコンの取得方法。

【請求項11】 マロニルイソフラボン配糖体溶液を直接、希塩酸含有アルコール水溶液中で加熱処理してイソフラボンアグリコンとすることを特徴とするイソフラボンアグリコンの取得方法。

【発明の詳細な説明】

表1

大豆(年度)	マロニルダイジン	マロニルゲニスチン
アメリカ種		
Vinton81(1989)	410	958
Vinton81(1990)	300	743

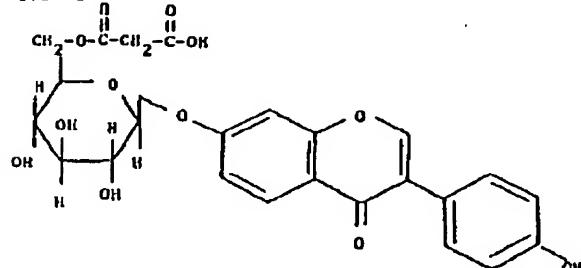
【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は大豆の水抽出液からマロニルイソフラボン配糖体の取得方法及びこれからイソフラボン配糖体さらにはイソフラボンアグリコンを取得する方法に関するものである。

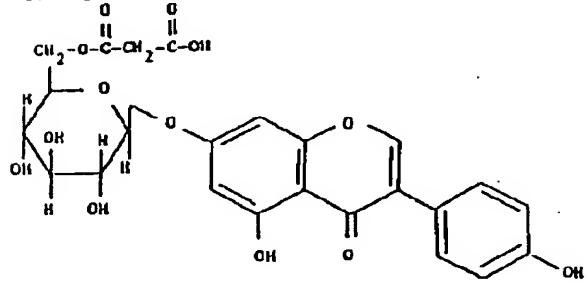
【0002】

【従来の技術及び課題】 従来、大豆にはイソフラボン化合物としてダイジン、グリシチン、ゲニスチン、アセチルダイジン及びアセチルゲニスチンあるいはこれらのアグリコンとしてダイゼイン、グリシテイン、ゲニステインが含有され、そしてこれらにはエストロゲン作用、抗菌作用、抗酸化作用、制ガン作用をはじめとして多くの薬理効果があることが確認されている。一方最近になって大豆中には

【化1】



【化2】



に示すマロニルダイジン及びマロニルゲニスチン等のマロニルイソフラボン配糖体の存在が確認され、これらが大豆中のイソフラボン化合物の主成分であることが判ってきた。このマロニルイソフラボン配糖体は水に溶け易く、またそれ自身抗酸化作用があり、またその構造の類似性から上記したような薬理効果が期待されている。

【0003】 大豆中のマロニルイソフラボン配糖体の含量は、大豆の種類、収穫時期等によってことなるが、文献 {J. Agric. Food Chem., 42, 1674(1994)} によれば表1の通りである。なお含量は大豆1gあたりのマイクログラムである。

Vinton81(1991)	237	545
Pioneer9111(1989)	690	1756
Pioneer9202(1989)	630	1705
Prize(1989)	709	1342
HP204(1989)	345	915
LS301(1989)	752	1558
KL72(1989)	198	1042
Strayer2233(1989)	385	883
日本種		
Keburi(1991)	562	1232
Keburi(1992)	322	670
Kuro daizu(1991)	375	1187
Kuro daizu(1992)	222	717
Raiden(1991)	407	1191
Raiden(1992)	242	723

【0004】またマロニルイソフラボン配糖体はアルカリ処理や加熱処理によりマロン酸とのエステル結合を切断し、ダイジンやゲニスチン等のイソフラボン配糖体とし、さらにこれらを酸処理や酵素処理してイソフラボンアグリコンとすることも容易である。すなわちマロニルイソフラボン配糖体はダイジンやゲニスチンを得るために原料としても利用できるものである。

【0005】大豆からマロニルイソフラボン配糖体を製造する方法としては特開平3-170495号に記載されているように、粉碎大豆をアルコール抽出したのち、その抽出物を数段の水不混和性有機溶媒で抽出処理して製造する方法が知られている。しかしながらこの方法は操作が複雑であり、またアルコール抽出による親油性成分の混入によって精製が難しくなり、更に収量が5～20%と低いという欠点がある。

【0006】

【課題を解決するための手段】このような現状に鑑み、本発明者らは大豆からマロニルイソフラボン配糖体を簡単な操作で取得する方法について検討した結果、大豆を水で抽出することにより、マロニルイソフラボン配糖体を比較的容易に抽出できること、及び該水抽出液をそのまま吸着剤に接触させることにより、抽出液中のマロニルイソフラボン配糖体は容易に吸着され、これをアルコール水溶液を用いて溶出することによりマロニルイソフラボン配糖体を効率よく取得できること、またこれをアルカリ処理等によりイソフラボン配糖体やイソフラボンアグリコンに変換することも容易であるという知見を得て本発明を完成了。

【0007】以下に本発明を詳細に説明する。マロニルイソフラボン配糖体を得るための原料は、丸大豆、脱皮大豆、脱脂大豆等であり、これらの水抽出液が用いられる。例えば丸大豆、脱皮大豆あるいは脱脂大豆を20～80℃の水に2～30時間浸漬して得られる抽出液であるが、丸大豆は抽出率が低いので、脱皮大豆や脱脂大豆が好適に用いられる。もちろん、豆腐や豆乳の製造に際

して生ずる浸漬廃液も有効に利用できる。そして大豆の水抽出液を得るのに好ましい態様としては、脱皮大豆を、カセイソーダ等によりpH10.0以下、好ましくは7.5～9.0に調整した45～65℃の水に2～4時間浸漬し、浸漬大豆を除いて得られる浸漬水を水抽出液とする。

【0008】この場合、浸漬水のpHを10.0以上にするとマロニルイソフラボン配糖体の収率が低下する。これはマロニルイソフラボン配糖体が分解し、イソフラボン配糖体となるためである。また大豆成分の抽出率を上げるためにには、浸漬温度は高いほうが有利であるが、70℃以上にするとマロニルイソフラボン配糖体が分解する。したがって抽出率と分解率とを考慮すると45～65℃が適当である。

【0009】また脱脂大豆を使用する場合の脱脂大豆は低変性脱脂大豆が好適であり、これを直接水に浸漬し、抽出するか、低変性脱脂大豆の粉碎物を水又はアルカリ水で抽出し、不溶残渣を除去したのち抽出液を塩酸でpH4.3付近で酸沈して得られる分離大豆蛋白を除いた液、すなわち大豆ホエーでもよい。

【0010】このような大豆の抽出液を必要により限外濾過膜を用いて蛋白質を除去した濾液、あるいは上記大豆ホエーのように塩酸でpH4.3程度に調整し、抽出液中に溶解している蛋白質を沈殿させ、その上澄液を吸着剤に接触させる。上記濾液あるいは上澄液は、そのまま吸着剤と接触させる方法と、濾液あるいは上澄液をカセイソーダでpH8.0程度に調整した後接触させる方法がある。

【0011】前者の場合は吸着剤に対する吸着量が増大し、後者の場合はマロニルイソフラボン配糖体とイソフラボン配糖体の分離が容易であるという利点がある。

【0012】いずれの場合でも、使用する吸着剤は、例えば合成吸着剤、活性炭、アルミナ等であり、具体的にはダイヤイオンHP-20（三菱化学製）、精製白鷺活性炭（武田薬品工業製）、活性アルミナ（和光純薬製）等を

挙げることができる。接触はバッチ法、カラム法等一般の方法でよく、例えば、吸着剤を充填したカラムに抽出液を通過させることにより行うことができ、こうすることにより抽出液中のマロニルイソフラボン配糖体の殆どが吸着剤に吸着される。

【0013】次いで吸着剤に吸着したマロニルイソフラボン配糖体をアルコール水溶液又はアルカリ性アルコール水溶液を用いて、マロニルイソフラボン配糖体を溶出させる。得られた溶液は減圧濃縮し、あるいは減圧濃縮後、凍結乾燥してマロニルイソフラボン配糖体の乾燥粉末を得る。

【0014】上記濃縮液あるいは乾燥粉末はマロニルダイジン及びマロニルゲニスチンの混合物であり、これを分別して取得する場合には、逆相クロマトグラフィーにより分取することができる。例えばODS樹脂（山村化学製）を充填したカラムに濃縮液を通液し、マロニルイソフラボン配糖体を吸着させ、アルコール水溶液で溶出してマロニルダイジン、マロニルゲニスチンを分画し、これらの画分を減圧濃縮後、凍結乾燥してマロニルダイジン及びマロニルゲニスチンの乾燥粉末を得る。

【0015】なお、マロニルダイジン及びマロニルゲニスチンを効率よく得るためにには以下の方法によることが好ましい。すなわち大豆の抽出液を吸着剤と接触させるまでは上記と同様であるが、溶出をアルコール水溶液の濃度を変えて順次行い、大まかにマロニルダイジンとマロニルゲニスチンを分別しこれらの溶出液をODSカラムで精製するのである。

【0016】本発明はこのようにして大豆の抽出液より簡単にマロニルイソフラボン配糖体、あるいはマロニルダイジン及びマロニルゲニスチンを分別して得ることができ、またこれらを原料としてアルカリ処理等してイソフラボン配糖体、さらにはイソフラボンアグリコンを得ることができる。

【0017】例えばマロニルイソフラボン配糖体を溶解した溶液をアンモニア、カセイソーダ、炭酸ソーダ等でpH8～13にして0.5時間以上放置することにより、マロニルイソフラボン配糖体をイソフラボン配糖体に変換する。アルカリ処理はpHが高いほど変換率は高くなる。またマロニルイソフラボン配糖体を溶解した溶液を70～150℃で0.5～1.2時間加熱することにより、マロニルイソフラボン配糖体はイソフラボン配糖体に変換される。加熱温度が高く、加熱時間が長いほど変換速度は早くなる。また溶液のpHと加熱温度を組み合わせることにより更に変換速度を早めることができる。こうして変換されたイソフラボン配糖体はODS樹脂に吸着させたのち、アルコール水溶液で溶出し、これを減圧濃縮、凍結乾燥することにより精製イソフラボン配糖体を得る。

【0018】上記の様にして得られたイソフラボン配糖体は、更に酸処理あるいは酵素処理によりイソフラボン

アグリコンとすることができます。例えば酸処理の場合、イソフラボン配糖体を、濃塩酸1に対してメタノール4.5の割合で混合した溶液で、70℃以上で6時間程度還流し、冷却後、水を加えて析出物を得る。これを濾過、水洗後、熱エタノールに溶解し、このエタノール溶液6に対し温水4を加え、室温にて放冷し、アグリコンを析出させる。なおこの場合の酸処理では、原料がマロニルイソフラボン配糖体であっても同様にアグリコンが得られる。

【0019】また酵素処理の場合、1/10Mリン酸塩緩衝液(pH5.0)に溶解した大豆由来のβ-グルコシダーゼ溶液にイソフラボン配糖体を分散させ、50℃で6時間程度反応させ、この反応液を分画分子量10,000の限外濾過膜で濾過し、濾液をODS樹脂カラムに吸着させたのち、アルコール水溶液で溶出し、これを減圧濃縮、凍結乾燥することにより精製イソフラボンアグリコンを得る。

【0020】

【実施例】以下実施例により本発明を具体的に説明する
実施例1

市販の米国大豆(10M)を120℃以上の雰囲気下で大豆品温が80℃程度となるように加熱後、ゴムローラーで半分に割り、冷却後種皮を分離除去した脱皮大豆3kgを、50℃の温水30L中にpHを8.0に調整しながら2時間浸漬、抽出し、抽出液25Lを得た。この抽出液を濃塩酸でpH4.0に調整し2時間放置後、デカンテーションより上清液20Lを得た。この上清液を合成吸着剤ダイアイオンHP-20(三菱化学製)を充填したカラム(5×21.5cm、420ml)に1L/hrの流速で通液し、マロニルイソフラボン配糖体を吸着させた後、蒸留水2Lで洗净した。次いで5%エタノール水溶液2L、10%、20%、30%、40%エタノール水溶液各3L及び50%エタノール水溶液2Lで溶出した。溶出液は1Lづつ分取し高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析し、マロニルダイジン画分とマロニルゲニスチン画分とに分け、これらを減圧下、50℃で約2Lまで濃縮し、マロニルダイジン1.61g、マロニルゲニスチン1.76gを含有する各濃縮液を得た。

【0021】<マロニルダイジンの精製>次に上記マロニルダイジン含有濃縮液を2N-NaOHでpH8.0に調整し、これを合成樹脂ODS樹脂充填カラム(4×16cm、200ml)に30ml/min.の流速で通液した後、蒸留水0.5Lで洗净した。次いで5%エタノール水溶液2Lで溶出を行い、目的物を含む画分を集め、濃縮後、凍結乾燥してマロニルダイジンをナトリウム塩として1.15g得た。

【0022】<マロニルゲニスチンの精製>また上記マロニルゲニスチン含有濃縮液を2N-NaOHでpH8.0に調整し、これを上記と同様にODS樹脂充填カラムに通液した後、蒸留水0.5Lで洗净した。次いで10%エ

タノール水溶液 2Lで溶出を行い、目的物を含む画分を集め、濃縮後、凍結乾燥してマロニルゲニスチンをナトリウム塩として 1.36g 得た。

【0023】こうして得られたマロニルダイジン及びマロニルゲニスチンの¹H 及び¹³C-NMR は、文献 {Agric. Biol. Chem., 55, (9) 2227(1991)} 記載の数値と一致した。また、原料として用いた脱皮大豆を Wang らの方法 {J. Agric. Food Chem., 42, 1666(1994)} に従ってマロニルイソフラボン配糖体を分析した。すなわち脱皮大豆を粉碎し、4.0 メッシュパスの試料 2.0g にアセトニトリル 100ml と 0.1N-HCl 20ml を加え、室温で 2 時間攪拌後、これを東洋濾紙 No.2 で濾過し、ロータリーエバポレーターで 30℃ 以下で濃縮乾固した。これを 8.0% メタノール 10ml で溶解後、メンブランフィルターで濾過してその 20 μl を HPLC に供した。3 回の分析の平均値は、脱皮大豆 100g 当たりマロニルダイジンは 6.8. 8mg、マロニルゲニスチンは 10.3. 3mg であった。以上のことから実施例 1 におけるマロニルダイジン及びマロニルゲニスチンの収率はそれぞれ 5.6% 及び 4.4% であった。

【0024】実施例 2

実施例 1 と同様の方法で得た脱皮大豆の温水抽出液 2.0L を、カセイソーダで pH 4.0 に調整し 2 時間放置後、濾過助剤（ラジオライト #500、昭和化学製）を添加し、ブナーロートで吸引濾過した。この濾液を活性炭（精製白鷺クロマト用、武田薬品工業製）を充填したカラム（5 × 2.2cm、4.30ml）に 1.5L/hr の流速で通液させてマロニルイソフラボン配糖体を吸着させた後、1% アンモニア水 3L でカラムを洗浄した。次いで 1% アンモニア含有 5.0% エタノール水溶液 5L で溶出し、得られた溶出液を減圧下、50℃ で濃縮し、マロニルダイジン 1.23g、マロニルゲニスチン 1.05g を含有する濃縮液 500ml を得た。この濃縮液を 2N のカセイソーダで pH 8.0 とし ODS 樹脂充填カラム（4 × 2.4cm、3.00ml）に流速 3.0ml/min. で通液し、蒸留水 0.5L で洗浄後、2%、5% 及び 10% エタノール水溶液各 2L で溶出を行い、5% エタノール水溶液の溶出区分よりマロニルダイジン画分を、10% エタノール水溶液の溶出区分よりマロニルゲニスチン画分を得、それを減圧下、50℃ で減圧濃縮した後、凍結乾燥し、マロニルダイジンをナトリウム塩として 65.2mg、マロニルゲニスチンをナトリウム塩として 41.2mg 得た。

【0025】実施例 3

低変性脱脂大豆 3kg に 30L の水を加え、1N-NaOH 溶液で pH 7.0 に調整しながら 25℃ で 2 時間攪拌後、遠心分離を行い 固形分を除き、上清を得た。この上清を 1N-HCl 溶液で pH 4.5 に調整後、遠心分離を行い ホエー区分 2.4L を得た。このホエー区分にはマロニルダイジンが 1.1g、マロニルゲニスチンが 0.8g 含まれていた。このホエー区分を実施例 1 と同様の方法で精製し、マロニルダイジン、マロニルゲニスチンをナトリウム塩としてそれぞれ 0.68g、0.44g 得た。

【0026】実施例 4

実施例 1 と同様の方法で得たマロニルダイジン及びマロニルゲニスチンのナトリウム塩各 1g をそれぞれ蒸留水 500ml に溶解し、冷却管を付けて沸騰水中で 5 時間加熱した。HPLC による分析の結果、配糖体への変換率は 90% 以上であった。これらを ODS 充填カラムで精製し、それぞれの配糖体であるダイジンを 0.73g、ゲニスチンを 0.67g を得た。

【0027】実施例 5

実施例 1 と同様の方法で得たマロニルダイジン及びマロニルゲニスチンのナトリウム塩各 2g をそれぞれ蒸留水 1000ml に溶解し、1N-NaOH で pH を 10 に調整した。これらを室温で 2.4 時間放置した。これらを HPLC で分析したところ配糖体への変換率は 90% 以上であった。これらを塩酸で中和し 実施例 4 と同様に ODS 充填カラムで精製し、それぞれの配糖体であるダイジンを 1.36g、ゲニスチンを 1.30g を得た。

【0028】実施例 6

実施例 5 で得たダイジン及びゲニスチン各 1g に、それぞれメタノール 4.5ml、濃塩酸 1.0ml を加え 6 時間還流しながら分解した。冷却後水を加え、濾過して 固形分を回収した。これを水洗後 9.0ml の 8.0% エタノール溶液で溶解後、濾紙濾過を行い、清澄液を得た。これを室温に放置し、結晶を析出させた。1 晚放置後この結晶を回収し、乾燥してダイゼイン、ゲニステインをそれぞれ 4.10mg、4.40mg を得た。

【0029】実施例 4～6 で得られたイソフラボン配糖体及びイソフラボンアグリコンは標品（フナコシ（株）販売）と物性が完全に一致した。

【0030】

【発明の効果】本発明により大豆の水抽出液から簡単に、効率よくマロニルイソフラボン配糖体、これからアルカリ処理等によりイソフラボン配糖体、更にイソフラボンアグリコンを得ることができる。

【手続補正書】

【提出日】平成8年2月9日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】007

【補正方法】変更

【補正内容】

【0007】以下に本発明を詳細に説明する。マロニルイソフラボン配糖体を得るための原料は、丸大豆、脱皮大豆、脱脂大豆等であり、これらの水抽出液が用いられる。例えば丸大豆、脱皮大豆あるいは脱脂大豆を20～

80°Cの水に2～30時間浸漬して得られる抽出液であるが、丸大豆は抽出率が低いので、脱皮大豆や脱脂大豆が好適に用いられる。もちろん、豆腐や豆乳の製造に際して生ずる浸漬廃液も有効に利用できる。さらには大豆煮汁、豆腐の「ゆ」も利用できる。そして大豆の水抽出液を得るのに好ましい態様としては、脱皮大豆を、カセイソーダ等によりpH10.0以下、好ましくは7.5～9.0に調整した45～65°Cの水に2～4時間浸漬し、浸漬大豆を除いて得られる浸漬水を水抽出液とする。

フロントページの続き

(72)発明者 山次 信幸

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン

株式会社内